Dr hab. Zenon Rajfur
Zakład Fizyki Materiałów Organicznych
Instytut Fizyki im. Mariana Smoluchowskiego
Uniwersytet Jagielloński
ul. St. Łojasiewicza 11
30-348 Kraków

Kraków 09-04-2016

UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Instytut Fizyki
im.
Mariana Smoluchowskiego

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Elizy Zimoląg

pt. „Rola endogennego pola elektrycznego w ukierunkowanej migracji mezenchymalnych komórek macierzystych w procesie gojenia rany".

Przedstawiona do recenzji praca doktorska Pani magister **Elizy Zimoląg** została wykonana w Zakładzie Biologii Komórki Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ pod opieką naukową prof. dr hab. Zbigniewa Madeji. Wyniki badań przedstawione w ramach tej pracy wpisują się doskonale w jeden z wiodących tematów badawczych tego Zakładu jakim jest badanie mechanizmów procesu elektrotaksji komórek. Należy podkreślić fakt, że jest to jedna z wiodących w świecie grup badawczych zajmujących się tą tematyką.

Migracja komórkowa czyli zdolność komórek do przemieszczania się jest jednym z fundamentalnych zjawisk biologicznych. Jest ona podstawą wielu procesów fizjologicznych jak np. rozwój embrionalny (morfogeneza), gojenie się ran, działanie układu odpornościowego czy rozwój układu nerwowego. Zaburzenia w migracji komórek prowadzą do powstawania wielu procesów patologicznych jak np. chronicznych stanów zapalnych, tworzenia blaszki miażdżycowej czy przerzutów nowotworów. Z tego powodu poznanie mechanizmów regulujących proces migracji komórkowej jest jednym z głównych problemów badawczych współczesnej biologii i biofizyki. Jednakże regulacja migracji komórkowej jest procesem bardzo złożonym, ponieważ biorą w nim udział setki molekuł, które wzajemnie oddziałują ze sobą w określonym czasie i precyzyjnie wybranym miejscu. Należy podkreślić, że są to oddziaływania dynamiczne, co zwykle ma decydujące znaczenie dla tego procesu. Badanie takich zjawisk wymaga zastosowania bardziej wyrafinowanych metod eksperymentalnych niż w przypadku obserwacji zjawisk statycznych. Migracja komórkowa jest zjawiskiem wieloaspektowym. Można ją klasyfikować biorąc pod uwagę różne kryteria, np. w zależności od liczebności migrujących komórek (pojedynczych komórek lub ich zespołów), sposobu

ul. St. Łojasiewicza 11
PL 30-348 Kraków
tel. +48(12) 664-47-03
fax +48(12) 664-49-06
e-mail: fizyka@uj.edu.pl

migracji (np. typu mezenchymalnego lub ameboidalnego) i wielu innych czynników wpływających na przebieg tego procesu. Klasyfikacja zjawiska w zależności od rodzaju czynników wywołujących i/lub nadających kierunek migrującym komórkom pozwala wyróżnić następujące typy migracji:

- chemotaksja (gradient stężenia czynnika chemicznego)
- durotaksja (sztywność/elastyczność podłoża, po którym migrują komórki)
- haptotaksja (gradient miejsc adhezji lub czynnika chemicznego związanego z podłożem)
- fotaksja (gradient natężenia światła)
- elektrotaksja/galwanotaksja (gradient potencjału elektrycznego).

Powyższy podział jest tylko przykładowy i nie wyczerpuje on wszystkich możliwych czynników wpływających na proces migracji.

Gojenie się ran jest jednym z procesów biologicznych gdzie migracja komórkowa odgrywa zasadniczą rolę. Wykazano, że każda faza tego procesu tj. faza zapalna, faza epitelializacji oraz faza przebudowy wiąże się z migracją określonych rodzajów komórek do miejsca zranienia. Podstawowym problemem badawczym jest określenie jakie czynniki biologiczne, chemiczne i fizyczne mają wpływ na gojenie się ran i pośrednio na migrację komórek związanych z tym procesem. Najczęściej badana jest rola czynników chemotaktycznych jak np. czynnika martwicy nowotworów TNFa czy odpowiednich interleukin, tym niemniej w celu pełnego opisania tego zjawiska należy uwzględnić także pozostałe czynniki. Jednym z nich są endogenne pola elektryczne występujące w normalnych i zaburzonych warunkach fizjologicznych jak np. w normalnej i uszkodzonej skórze. W ostatnich latach postuluje się, że takie pola elektryczne mogą być jednym z czynników wspomagających rekrutację niektórych typów komórek np. komórek macierzystych, do miejsc uszkodzeń tkanki poprzez efekt elektrotaksji. Dlatego efekt ten jest przedmiotem bardzo intensywnych badań naukowych.

Tematyka i cele rozprawy

Ogólnym zagadnieniem naukowym, poruszonym w przedstawionej pracy, była weryfikacja hipotezy, według której endogenne pola elektryczne są jednym z czynników determinujących rekrutację niektórych typów komórek macierzystych do miejsc uszkodzenia tkanki. Celami pośrednimi były (Rozdział II, str. 36):

1. Zbadanie wpływu zewnętrznego pola elektrycznego prądu stałego o fizjologicznej wartości na aktywność migracyjną adherentnej frakcji komórek szpiku kostnego myszy.
2. Rozdzielenie populacji komórek migrujących w przeciwnych kierunkach (anody i katody) oraz ich scharakteryzowanie.

3. Zbadanie zaangażowania wewnątrzkomórkowych szlaków sygnalizacyjnych w przekazywanie informacji o kierunku migracji w obecności pola.
4. Próba zdefiniowania różnic w mechanizmach reakcji elektrotaktycznej komórek migrujących w kierunku anody i katody.

Głównym obiektem badawczym przedstawionej rozprawy doktorskiej są komórki z adherentnej frakcji komórek mysiego szpiku kostnego BMAC (*ang. Bone Marrow Adherent Cells*) izolowanych z myszy szczepu C57B1 w wieku 4-6 tygodni.

Struktura rozprawy

Rozprawa doktorska Pani Elizy Zimoląg składa się z siedmiu głównych rozdziałów, które z kolei zawierają odpowiednie podrozdziały. Układ ten jest stosowany w wielu dysertacjach doktorskich. Zasadniczą treść pracy poprzedzają: strona tytułowa (1 strona), Spis treści i źródła finansowania (3 strony), podziękowania (2 strony) i Wykaz skrótów (1 strona). Po nich następują: Streszczenie w języku polskim (3 strony) i angielskim (2 strony), Wstęp (23 strony), Cel pracy (1 strona), Materiały i Metody (17 stron), Wyniki (39 stron), Dyskusja (20 stron) oraz Suplement - Spis filmów (1 strona). Rozprawę zamyka Bibliografia (13 stron). Do dysertacji dołączony jest odrębny Spis publikacji oraz doniesień konferencyjnych Doktorantki (4 strony). Dysertacja liczy w sumie 126 stron. Cytowane piśmiennictwo zawiera 159 pozycji literaturowych. Dobór literatury jest właściwy i wyczerpujący, obejmuje on zarówno pozycje starsze jak i najnowsze z 2016 roku. Praca zawiera 27 rycin oraz 10 tabel. Rozprawa jest napisana bardzo starannie i zrozumiale dla szerokiego grona czytelników, niekoniecznie ekspertów z danej dziedziny. Pod względem graficznym praca jest bardzo estetyczna i przejrzysta. Moje drobne uwagi stylistyczne i edytorskie są umieszczone w **Uwagach szczegółowych**.

Integralną częścią dysertacji są dołączone na płycie DVD filmy z obserwacji mikroskopowych pokazujące:

1. migrację komórek BMAC w warunkach kontrolnych – natężenie pola elektrycznego 0 mV/mm (film w formacie AVI, szybkość odtwarzania 7 ramek/s)
2. migrację komórek BMAC w polu elektrycznym – natężenie pola elektrycznego 300 mV/mm (film w formacie AVI, szybkość odtwarzania 7 ramek/s)
3. migrację oddzielonych komórek K-BMAC (CD45-) w polu elektrycznym – natężenie pola elektrycznego 300 mV/mm (film w formacie AVI, szybkość odtwarzania 7 ramek/s)

4. migrację oddzielonych komórek A-BMAC (CD45+) w polu elektrycznym – natężenie pola elektrycznego300 mV/mm (film w formacie AVI, szybkość odtwarzania 7 ramek/s)
5. nawrót komórki A-BMAC po zamianie położenia elektrod względem komórki - natężenie pola elektrycznego 300 mV/mm (film w formacie AVI, szybkość odtwarzania 5 ramek/s)
6. nawrót komórki K-BMAC po zamianie położenia elektrod względem komórki - natężenie pola elektrycznego 300 mV/mm (film w formacie AVI, szybkość odtwarzania 5 ramek/s)

Jakość zarejestrowanych filmów jest bardzo dobra i wraz z dołączonym opisem pozwala czytelnikowi zrozumieć wyniki tych eksperymentów. Na filmach 1, 3 i 4 można zauważyć na początku sekwencji przesuwanie się całego pola widzenia w kierunku katody co może wskazywać na powolną stabilizację warunków eksperymentalnych jak np. temperatura olejku imersyjnego.

Opis merytoryczny rozprawy

Dysertacja rozpoczyna się od rozdziałów **Streszczenie** oraz **Abstract,** w których opisano zwięźle podstawy naukowe pracy, główne metody badawcze oraz otrzymane wyniki.

We **Wstępie** do swojej dysertacji Doktorantka przedstawia aktualny stan wiedzy z zakresu tematyki jej badań, posiłkując się obszernym i wyczerpującym przeglądem literaturowym. Część ta składa się z dwóch podrozdziałów: w pierwszym z nich Doktorantka opisuje właściwości skóry oraz procesy zachodzące podczas zranienia i następnie gojenia się rany a drugi podrozdział omawia zjawisko elektrotaksji. Jest to bardzo logiczny podział, gdyż tylko w taki sposób można wprowadzić czytelnika w złożoną tematykę rozprawy. Obie części są napisane w sposób przykładowy: najpierw ukazana jest szeroka perspektywa poruszonej tematyki badawczej aby później skupić się na jej szczegółowych aspektach istotnych dla przeprowadzanych eksperymentów. Doktorantka porusza się w omawianej tematyce swobodnie, co świadczy o jej dużej wiedzy w tym zakresie.

W rozdziale **Cel Pracy** Doktorantka w sposób jasny i precyzyjny określa cele badawcze, które zamierzała osiągnąć w swojej pracy.

Część doświadczalną przedstawionej pracy doktorskiej stanowi rozdział zatytułowany: **Materiały i Metody**. Jest on również podzielony na dwa podrozdziały. W krótkim podrozdziale **Materiały** (3 strony) Doktorantka wymienia nazwy i źródła pochodzenia płynów hodowlanych, inhibitorów, odczynników chemicznych oraz innych materiałów użytych w jej badaniach.

Podrozdział **Metody** jest znacznie obszerniejszy (15 stron). Wynika to z faktu, że Doktorantka wykorzystała w swojej pracy całe spektrum technik eksperymentalnych, począwszy od metod izolacji komórek szpiku kostnego myszy, ich hodowli, poprzez wymagające techniki mikroskopowe takie jak fotografia poklatkowa, wybarwienia immunofluorescencyjne i mikroskopia fluorescencyjna a kończąc na zaawansowanej technice analizy proteomicznej populacji komórek K-BMAC i A-BMAC. Podrozdział zamyka opis procedur teoretycznych wykorzystanych do analizy kinetyki nawrotu komórek po zmianie biegunowości przyłożonego pola elektrycznego oraz analizy statystycznej otrzymanych wyników. Procedury eksperymentalne opisane są w sposób zwarty i przejrzysty, a jednocześnie wyczerpujący. Wykorzystany zestaw metod doświadczalnych był dobrze dobrany do realizacji wyznaczonych celów badawczych.

Rezultaty badań Doktorantki są przedstawione w rozdziale **Wyniki,** składającym się z 6 podrozdziałów, które zawierają omówienie wyników cząstkowych tej pracy. Rozdział ten można podzielić na dwie logiczne części – część pierwszą składającą się z podrozdziału pierwszego i drugiego, której celem jest stworzenie podstaw metodycznych do prowadzenia dalszych eksperymentów oraz część drugą, w skład której wchodzą podrozdział trzeci, czwarty, piąty i szósty, gdzie bazując na metodach rozwiniętych w części pierwszej, Doktorantka próbuje wskazać mechanizmy odpowiedzialne za kierunkową migrację komórek w polu elektrycznym.

Pierwszy podrozdział **Wyników** przedstawia rezultaty badania wpływu zewnętrznego pola elektrycznego prądu stałego na migrację komórek BMAC. Do najważniejszych osiągnięć tej części pracy należy:

a. wykazanie, że w komórkach BMAC migrujących w polu elektrycznym istnieją dwie subpopulacje komórek, różniących się morfologicznie i migrujących w przeciwnych kierunkach (komórki K-BMAC i A-BMAC)

b. wykazanie, że obie populacje zachowują silną kierunkowość elektrotaksji w polu elektrycznym o natężeniu 300 mV/mm, chociaż różnią się innymi parametrami kinetycznymi migracji jak np. średnia prędkość ruchu czy średnie przemieszczenie całkowite

W dalszym etapie badań, którego wyniki są zaprezentowane w podrozdziale drugim, Doktorantka rozdziela dwie subpopulacje komórek BMAC na dwie czyste populacje komórek migrujących w kierunku katody lub anody. Pokazuje, że komórki A-BMAC wykazują ko-ekspresję antygenów CD45 oraz CD11b (charakterystycznego dla makrofagów), natomiast w populacji komórek K-BMAC występują mezenchymalne komórki macierzyste (BM-MSC).

Część druga **Wyników** zawiera rezultaty prac eksperymentalnych, których celem była identyfikacja mechanizmu lub mechanizmów, odpowiedzialnych za kierunkową migrację komórek BMAC w polu elektrycznym. Doktorantka zastosowała właściwą i dobrze przemyślaną strategię badawczą. W swoich doświadczeniach zbadała rolę:

a. małych białek G z rodziny Rho
b. wewnątrzkomórkowych kinaz serynowo-treoninowych
c. białek bezpośrednio wpływających na architekturę cytoszkieletu jak np. Arp2/3
d. białek powierzchniowych

oraz jonów wapnia w przekazywaniu informacji o kierunku migracji komórek BMAC w obecności pola elektrycznego. Wykonała też badania dynamiki reakcji nawrotu komórek po odwróceniu biegunowości pola w celu określenia skali czasowej zmian morfologii i parametrów migracji komórek. Słusznie wybrała kierunkowość migracji jako główny wskaźnik wpływu danego czynnika na mechanizmy elektrotaksji.

Główne wyniki uzyskane w tej części pracy to:

a. wykazanie, że elektrotaksja komórek A-BMAC zależy w większym stopniu od małych białek G z rodziny Rho
b. wykazanie, że w komórkach K-BAMC w początkowych etapach reakcji elektrotaktycznej istotną rolę pełnią 3-kinaza fosfatydyloinozytolu i kompleks Arp2/3
c. wykazanie, że depolimeryzacja mikrotubul zdecydowanie obniża kierunkowość ruchu tylko w komórkach A-BMAC

Należy podkreślić, że przeprowadzone badania były pracochłonne i skomplikowane oraz wymagały najwyższych umiejętności eksperymentalnych.

Doktorantka przeprowadziła wnikliwą analizę otrzymanych wyników w obszernym rozdziale (20 stron) **Dyskusja**. Omówiła trudne zagadnienia poruszone w tej pracy oraz dokonała, moim zdaniem, właściwej interpretacji wyników badań eksperymentalnych. Rezultaty swoich badań przedstawiła w kontekście literatury naukowej, pokazując jak jej praca wpisuje się w najnowsze osiągnięcia w tej dziedzinie. Trafnie zauważyła, że ciągle jeszcze nie jest znany mechanizm, który jest odpowiedzialny za odmienne kierunki migracji różnych komórek w polu elektrycznym. Szczegółowo omówiła rezultaty badań opisane w części drugiej rozdziału **Wyniki**, które wskazują na to, że mechanizm regulacji elektrotaksji i rekrutacji komórek do miejsca zranienia może być wypadkową działania różnych czynników humoralnych i fizycznych jak np. pola elektrycznego oraz że jest on bardziej skomplikowany niż to pierwotnie zakładała. Sposób przeprowadzenia dyskusji dowodzi, że Doktorantka posiada doskonały warsztat naukowy wymagany do prowadzenia samodzielnych badań w tym trudnym dziale nauki.

Oceniając stronę merytoryczną dysertacji, stwierdzam, że treść prezentowanej pracy jest zgodna z podanym tytułem, tematyka badawcza jest oryginalna i bardzo interesująca. Zastosowana metodyka badań jest poprawna, podobnie jak analiza i interpretacja otrzymanych wyników. Użyto zaawansowanych metod eksperymentalnych i teoretycznych np. analizy wielkości i kształtu komórki metodą Dunna i Browna (pozycja literaturowa 111). Załączona bibliografia jest obszerna i wyczerpująca. Muszę podkreślić, że narracja zastosowana w tej pracy sprawia, że czyta się ją z przyjemnością. Rozprawa ta nie budzi większych zastrzeżeń, jednak - z obowiązku recenzenta - chciałbym wnieść kilka uwag do prezentowanej pracy:

1. W sekcji „Metody", podrozdział „Rejestracja i analiza aktywności ruchowej komórek" brakuje mi danych na temat obiektywów użytych do wykonywania obserwacji oraz rodzaju kontrastu optycznego (lub jego braku) zastosowanego do prowadzenia obserwacji mikroskopowych oraz nagrywania odpowiednich filmów. Także w podrozdziale III.2.5 należałoby podać informację o rodzaju filtrów optycznych wykorzystanych w mikroskopii fluorescencyjnej.
2. Czy doktorantka rozważała możliwy wpływ innych czynników niż tylko natężenie przyłożonego pola elektrycznego na migrację komórek BMAC w zastosowanym układzie eksperymentalnym?
3. Otrzymane wyniki ze względu na ich wagę i aktualność podjętej tematyki na pewno będą stanowiły bazę dla dalszych prac badawczych. Dlatego w przedstawionej pracy brakuje mi rozdziału wskazującego kierunki przyszłych badań, które pozwolą na lepsze poznanie mechanizmów zjawiska elektrotaksji.

Uwagi szczegółowe

1. W „**Spisie Treści**" nie zostały wymienione podrozdziały: III.2.9 (str. 48), III.2.9.1 (str. 48) i III.2.9.2 (str. 49).
2. Jako **Ryc. 5** są opisane dwie kolejne ryciny: jedna na str.43 a druga na str. 52.
3. Str. 64 i 65 – zaburzona kontynuacja tekstu pomiędzy ostatnim zdaniem na str. 64 a pierwszym na str. 65.
4. Str. 80 – w tekście jest odnośnik do części C Ryc.17. Oznaczenia tego brak zarówno w obrębie ryciny jak i w legendzie.
5. Str. 81 - w tekście jest odnośnik do części C Ryc.18. Oznaczenia tego brak zarówno w obrębie ryciny jak i w legendzie.

6. Str. 85 wiersz 6 od góry– znajduje się tam odnośnik do rozdziału III.5.3. Powinno być IV.5.3.
7. Str.90 - w tekście jest odnośnik do części C Ryc.25. Oznaczenia tego brak w obrębie ryciny.
8. Str.92 - w tekście jest odnośnik do części C Ryc.26. Oznaczenia tego brak w obrębie ryciny.
9. Str. 121 – drobne literówki w pisowni nazwisk autorów.

Podsumowanie

Przedstawioną rozprawę doktorską oceniam bardzo wysoko. Postawione na początku ambitne ale realistyczne cele badawcze zostały zrealizowane. Doktorantka w swojej pracy wykorzystała niezwykle szeroki wachlarz nowoczesnych technik badawczych, od klasycznych technik biochemicznych poprzez techniki biologii molekularnej do zaawansowanych metod mikroskopowych, co świadczy niezwykle pozytywnie o jej umiejętnościach eksperymentalnych. Otrzymane wyniki otwierają nowe kierunki badawcze w dziedzinie elektrotaksji. Doktorantka wykazała się umiejętnością samodzielnego prowadzenia badań naukowych i rozwiązywania złożonych problemów badawczych. Rozprawa doktorska zatytułowana „Rola endogennego pola elektrycznego w ukierunkowanej migracji mezenchymalnych komórek macierzystych w procesie gojenia rany" spełnia wszystkie warunki określone w art.13 ustawy z dnia 14 marca 2003 o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki i wobec tego proszę Wysoką Radę Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ o dopuszczenie **Pani mgr Elizy Zimoląg** do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Zenon Rajfur

dr hab. Zenon Rajfur